

N

09/762550

PCT/JP 99/04533

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

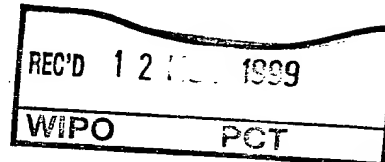
22.09.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 3月 2日



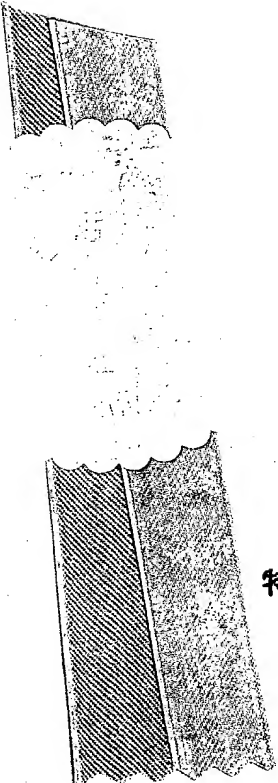
出願番号
Application Number:

平成11年特許願第054302号

出願人
Applicant(s):

中外製薬株式会社

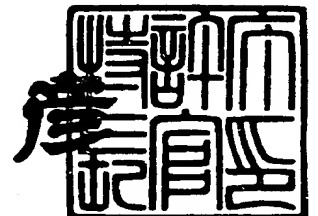
**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



1999年10月29日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3073541

【書類名】 特許願

【整理番号】 993213

【提出日】 平成11年 3月 2日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【国際特許分類】 A61K 39/395

【発明の名称】 I L - 6 アンタゴニストを有効成分として含有する肺炎
の予防又は治療剤

【請求項の数】 13

【発明者】

 【住所又は居所】 福岡県福岡市南区若久 6 丁目 2 8 - 3 3

 【氏名】 船越 顕博

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都世田谷区羽根木 2 - 5 - 1 3

 【氏名】 宮坂 京子

【特許出願人】

 【識別番号】 000003311

 【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100077517

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 石田 敬

 【電話番号】 03-5470-1900

【選任した代理人】

 【識別番号】 100087871

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

 【識別番号】 100088269

 【弁理士】

【氏名又は名称】 戸田 利雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

【選任した代理人】

【識別番号】 100081330

【弁理士】

【氏名又は名称】 樋口 外治

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成10年特許願第251796号

【出願日】 平成10年 8月24日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036135

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9814920

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 IL-6 アンタゴニストを有効成分として含有する脾炎の予防又は治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 インターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストを有効成分として含有する脾炎の予防又は治療剤。

【請求項 2】 IL-6 アンタゴニストが IL-6 受容体に対する抗体であることを特徴とする請求項 1 記載の予防又は治療剤。

【請求項 3】 IL-6 受容体に対する抗体が IL-6 受容体に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 2 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 4】 IL-6 受容体に対する抗体がヒト IL-6 受容体に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 3 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 5】 IL-6 受容体に対する抗体がマウス IL-6 受容体に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 3 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 6】 IL-6 受容体に対する抗体が組換え型抗体であることを特徴とする請求項 2 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の予防又は治療剤。

【請求項 7】 ヒト IL-6 受容体に対するモノクローナル抗体が PM-1 抗体であることを特徴とする請求項 4 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 8】 マウス IL-6 受容体に対するモノクローナル抗体が MR16-1 抗体であることを特徴とする請求項 5 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 9】 IL-6 受容体に対する抗体が IL-6 受容体に対するキメラ抗体又はヒト型化抗体であることを特徴とする請求項 2 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の予防又は治療剤。

【請求項 10】 IL-6 受容体に対するヒト型化抗体がヒト型化 PM-1 抗体であることを特徴とする請求項 9 に記載の予防又は治療剤。

【請求項 11】 脾炎が、急性脾炎である、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の予防又は治療剤。

【請求項 12】 IL-6 アンタゴニストを有効成分として含有する脾炎における脾臓浮腫抑制剤。

【請求項 1 3】 IL-6受容体に対する抗体を有効成分として含有する脾炎における脾臓浮腫抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明はインターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストを有効成分として含有する脾炎の予防又は治療剤に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

IL-6はB 細胞刺激因子2 (BSF2)あるいはインターフェロン β 2 とも呼称されたサイトカインである。IL-6は、B リンパ球系細胞の活性化に関与する分化因子として発見され (Hirano, T. et al., Nature (1986) 324, 73-76)、その後、種々の細胞の機能に影響を及ぼす多機能サイトカインであることが明らかになった (Akira, S. et al., Adv. in Immunology (1993) 54, 1-78)。IL-6は、T リンパ球系細胞の成熟化を誘導することが報告されている (Lotz, M. et al., J. Exp. Med. (1988) 167, 1253-1258)。

【0 0 0 3】

IL-6は、細胞上で二種の蛋白質を介してその生物学的活性を伝達する。一つは、IL-6が結合する分子量約80kDのリガンド結合性蛋白質のIL-6受容体である (Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981, Yamasaki, K. et al., Science (1987) 241, 825-828)。IL-6受容体は、細胞膜を貫通して細胞膜上に発現する膜結合型の他に、主にその細胞外領域からなる可溶性IL-6受容体としても存在する。

もう一つは、非リガンド結合性のシグナル伝達に係わる分子量約130kD の膜蛋白質gp130 である。IL-6とIL-6受容体はIL-6/IL-6受容体複合体を形成し、次いでgp130 と結合することにより、IL-6の生物学的活性が細胞内に伝達される (Taga, T. et al., Cell (1989) 58, 573-581)。

【0 0 0 4】

IL-6アンタゴニストは、IL-6の生物学的活性の伝達を阻害する物質である。こ

れまでに、IL-6に対する抗体（抗IL-6抗体）、IL-6受容体に対する抗体（抗IL-6受容体抗体）、gp130 に対する抗体（抗gp130 抗体）、IL-6改変体、IL-6又はIL-6受容体部分ペプチド等が知られている。

抗IL-6受容体抗体に関しては、いくつかの報告がある（Novick, D. et al., Hybridoma (1991) 10, 137-146、Huang, Y. W. et al., Hybridoma (1993) 12, 621-630、国際特許出願公開番号W0 95-09873、フランス特許出願公開番号FR 2 694767、米国特許番号US 521628）。その一つであるマウス抗体PM-1（Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906）の相補性決定領域（CDR; complementarity determining region）をヒト抗体へ移植することにより得られたヒト型化PM-1抗体が知られている（国際特許出願公開番号W0 92-19759）。

【0005】

膵炎（pancreatitis）は、膵酵素活性化により膵組織内において自己消化を生ずる炎症性疾患である。これまでに、急性膵炎患者と健常人の末梢血単核球のIL-6産生量を比較すると、急性膵炎患者で有意に高いことや、全身性の合併症を発症している急性膵炎について、合併症の認められない症例と比較すると、末梢血単核球からのIL-6産生が高値であることが報告されている（de Beaux A.C. et al., Brit. J. Surgery, 83, 1071-5, 1996）。また、血中IL-6値は、急性膵炎患者の重症例で、より高値を示すと共に、他のパラメーターに比較し早期に反応することから、膵炎の重症度を予測するための指標になると考えられてきた（Inagaki, T. et al., Pancreas, 14, 1-8, 1997）。

【0006】

これまで急性膵炎では、IL-1及びTNF が病態と深く関係することが示唆されており、両サイトカインに対する受容体を欠くマウスでは重症化せず、死亡率も著しく減少することが報告されている（Denham, W. et al., Gastroenterology, 113, 1741-6, 1997）。さらに、それらの阻害剤を用いた膵炎の治療の試みが動物モデルを用いてなされている（Norman, J. et al., Surgery, 117, 648-655, 1995; Hughes, C.B. et al., American J. Surgery, 171, 274-280, 1996, Norman, J. et al., Surgery, 120, 515-521, 1996）。

しかしながら、これまでに膵炎において抗IL-6受容体抗体等のIL-6アンタゴニ

ストを用いIL-6の生物学的活性を特異的に抑制する試みはなされておらず、抗IL-6受容体抗体等のIL-6アンタゴニストが膵炎に治療効果を示すことは知られていなかった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、前記の欠点を有さない膵炎の予防又は治療剤を提供しようとするものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】

すなわち、本発明は、（１）IL-6アンタゴニストを有効成分として含有する膵炎の予防又は治療剤を提供する。

本発明はまた、（２）IL-6受容体に対する抗体を有効成分として含有する膵炎の予防又は治療剤を提供する。

本発明はまた、（３）IL-6受容体に対するモノクローナル抗体を有効成分として含有する膵炎の予防又は治療剤を提供する。

【0009】

本発明はまた、（４）ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体を有効成分として含有する膵炎の予防又は治療剤を提供する。ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体は、好ましくはPM-1抗体である。

本発明はまた、（５）マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体を有効成分として含有する膵炎の予防又は治療剤を提供する。マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体は、好ましくはMR16-1抗体である。

本発明はまた、（６）IL-6受容体に対する組換え型抗体を有効成分として含有する膵炎の予防又は治療剤を提供する。IL-6受容体に対する組換え型抗体は、好ましくはヒト抗体定常領域（C 領域）を有する。

【0010】

本発明はまた、（７）IL-6受容体に対するキメラ抗体又はヒト型化抗体を有効成分として含有する膵炎の予防又は治療剤を提供する。

本発明はまた、（８）ヒト型化PM-1抗体を有効成分として含有する膵炎の予防

又は治療剤を提供する。

本発明はまた、(9) 前記(1)～(8)に記載のIL-6アンタゴニストを有効成分として含有する急性膵炎又は慢性膵炎の予防又は治療剤を提供する。急性膵炎又は慢性膵炎は、例えば重症膵炎又は軽症膵炎である。

本発明はまた、(10) 前記(1)～(8)に記載のIL-6アンタゴニストを有効成分として含有する膵炎における膵臓浮腫抑制剤を提供する。

本発明はさらに、(11) 前記(3)～(8)に記載のIL-6受容体に対する抗体を有効成分として含有する膵炎における膵臓浮腫抑制剤を提供する。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明で使用されるIL-6アンタゴニストは、膵炎の予防又は治療効果、又は膵炎における膵臓浮腫抑制効果を示すものであれば、その由来、種類および形状を問わない。

IL-6アンタゴニストは、IL-6によるシグナル伝達を遮断し、IL-6の生物学的活性を阻害する物質である。IL-6アンタゴニストは、好ましくはIL-6、IL-6受容体及びgp130 のいずれかの結合に対する阻害作用を有する物質である。IL-6アンタゴニストとしては、例えば抗IL-6抗体、抗IL-6受容体抗体、抗gp130 抗体、IL-6改変体、可溶性IL-6受容体改変体あるいはIL-6又はIL-6受容体の部分ペプチドおよび、これらと同様の活性を示す低分子物質が挙げられる。

【0012】

本発明で使用される抗IL-6抗体は、公知の手段を用いてポリクローナル又はモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗IL-6抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体はIL-6と結合することにより、IL-6のIL-6受容体への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する。

【0013】

このような抗体としては、MH166 (Matsuda, T. et al., Eur. J. Immunol. (1

988) 18, 951-956) やSK2 抗体 (Sato, K. et al., 第21回 日本免疫学会総会、学術記録(1991) 21, 166) 等が挙げられる。

抗IL-6抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、IL-6を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

【0 0 1 4】

具体的には、抗IL-6抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトIL-6は、Eur. J. Biochem (1987) 168, 543-550、J. Immunol. (1988) 140, 1534-1541、あるいはAgr. Biol. Chem. (1990) 54, 2685-2688 に開示されたIL-6遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。

IL-6の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中又は、培養上清中から目的のIL-6蛋白質を公知の方法で精製し、この精製IL-6蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、IL-6蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

【0 0 1 5】

本発明で使用される抗IL-6受容体抗体は、公知の手段を用いてポリクローナル又はモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗IL-6受容体抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体はIL-6受容体と結合することにより、IL-6のIL-6受容体への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する。

【0 0 1 6】

このような抗体としては、MR16-1抗体 (Tamura, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 11924-11928)、PM-1抗体 (Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906)、AUK12-20抗体、AUK64-7 抗体あるいはAUK146-1

5 抗体（国際特許出願公開番号W0 92-19759）などが挙げられる。これらのうちで、特に好ましい抗体としてPM-1抗体が挙げられる。

【0 0 1 7】

なお、PM-1抗体産生ハイブリドーマ細胞株は、PM-1として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1 丁目1 番3 号）に、平成2 年7 月10日に、FERM BP-2998としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。また、MR16-1 抗体産生ハイブリドーマ細胞株は、Rat-mouse hybridoma MR16-1として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1 丁目1 番3 号）に、平成9 年3 月13日に、FERM BP-5875としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

【0 0 1 8】

抗IL-6受容体モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、IL-6受容体を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、抗IL-6受容体抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトIL-6受容体は、欧州特許出願公開番号EP 325474 に、マウスIL-6受容体は日本特許出願公開番号特開平3-155795に開示されたIL-6受容体遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。

【0 0 1 9】

IL-6受容体蛋白質は、細胞膜上に発現しているものと細胞膜より離脱しているもの（可溶性IL-6受容体）（Yasukawa, K. et al., J. Biochem. (1990) 108, 673-676）との二種類がある。可溶性IL-6受容体抗体は細胞膜に結合しているIL-6受容体の実質的に細胞外領域から構成されており、細胞膜貫通領域あるいは細胞膜貫通領域と細胞内領域が欠損している点で膜結合型IL-6受容体と異なっている。IL-6受容体蛋白質は、本発明で用いられる抗IL-6受容体抗体の作製の感作抗原として使用されうる限り、いずれのIL-6受容体を使用してもよい。

【 0 0 2 0 】

IL-6受容体の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中又は、培養上清中から目的のIL-6受容体蛋白質を公知の方法で精製し、この精製IL-6受容体蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、IL-6受容体を発現している細胞やIL-6受容体蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

ヒトIL-6受容体をコードするcDNAを含むプラスミドpIBIBSF2R を含有する大腸菌 (E.coli) は、平成元年 (1989年) 1 月9 日付で工業技術院生命工学工業技術研究所に、HB101-pIBIBSF2R として、受託番号FERM BP-2232としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

【 0 0 2 1 】

本発明で使用される抗gp130 抗体は、公知の手段を用いてポリクローナル又はモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗gp130 抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体はgp130 と結合することにより、IL-6/IL-6受容体複合体のgp130 への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する。

【 0 0 2 2 】

このような抗体としては、AM64抗体 (特開平3-219894)、4B11抗体および2H4抗体 (US 5571513) B-S12 抗体およびB-P8抗体 (特開平8-291199) などが挙げられる。

抗gp130 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、gp130 を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナル抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

【 0 0 2 3 】

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。例え

ば、抗体取得の感作抗原として使用されるgp130 は、欧州特許出願公開番号EP 4 11946 に開示されたgp130 遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。

gp130 の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中又は、培養上清中から目的のgp130 蛋白質を公知の方法で精製し、この精製gp130 受容体蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、gp130 を発現している細胞やgp130 蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

【0024】

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

【0025】

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付される。細胞融合に付される好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P3X63Ag8.653 (Kearney, J. F. et al . J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978

) 276, 269-270)、F0 (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133) 等が適宜使用される。

【0026】

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、センダイウィルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

【0027】

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1-10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM 培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37℃程度に加温したPEG 溶液、例えば、平均分子量1000-6000 程度のPEG 溶液を通常、30-60 % (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

【0028】

当該ハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、HAT 培養液 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択される。当該HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞 (非融合細胞) が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通

常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングが行われる。

【0029】

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球を *in vitro* で所望の抗原蛋白質又は抗原発現細胞で感作し、感作B リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、所望の抗原又は抗原発現細胞への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878 参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原又は抗原発現細胞を投与し、前述の方法に従い所望のヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号WO 93/12227、WO 92/03918、WO 94/02602、WO 94/25585、WO 96/34096、WO 96/33735 参照）。

【0030】

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

【0031】

例えば、抗IL-6受容体抗体産生ハイブリドーマの作製は、特開平3-139293に開示された方法により行うことができる。工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1 丁目1 番3 号）に、平成2 年7 月10日に、FERM BP-2998としてブタベスト条約に基づき国際寄託されたPM-1抗体産生ハイブリドーマをBALB/cマウスの腹腔内に注入して腹水を得、この腹水からPM-1抗体を精製する方法や、本ハイブリドーマを適当な培地、例えば、10%ウシ胎児血清、5 %BM-Condimed H1（Boehringer Mannheim 製）含有RPMI1640培地、ハイブリドーマSFM 培地（GIBCO-BRL 製）、PFHM-II 培地（GIBCO-BRL 製）等で培養し、その培養上清からPM-1

抗体を精製する方法で行うことができる。

【 0 0 3 2 】

本発明には、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を用いることができる（例えば、Borreb aeck C. A. K. and Larrick J. W. THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照）。

【 0 0 3 3 】

具体的には、目的とする抗体を産生する細胞、例えばハイブリドーマから、抗体の可変（V）領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法（Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299）、AGPC法（Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159）等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit（Pharmacia製）等を使用してmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit（Pharmacia製）を用いることによりmRNAを直接調製することができる。

【 0 0 3 4 】

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit等を用いて行うことができる。また、cDNAの合成および増幅を行うには5'-Ampli FINDER RACE Kit（Clontech製）およびPCRを用いた5'-RACE法（Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932）を使用することができる。得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作成し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、デオキシ法により確認する。

【 0 0 3 5 】

目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。

又は、抗体のV 領域をコードするDNA を、抗体C 領域のDNA を含む発現ベクターへ組み込んでもよい。

本発明で使用する抗体を製造するには、後述のように抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

【0036】

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ (Chimeric) 抗体、ヒト型化 (Humanized) 抗体を使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V 領域をコードするDNA をヒト抗体C 領域をコードするDNA と連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる (欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号WO 92-19759 参照)。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

【0037】

例えば、キメラPM-1抗体のL 鎖およびH 鎖のV 領域をコードするDNA を含むプラスミドは、各々pPM-k3およびpPM-h1と命名され、このプラスミドを有する大腸菌は、National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limitedに、1991年2月11日に、各々NCIMB 40366 及びNCIMB40362としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

ヒト型化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR) をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている (欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号WO 92-19759 参照)。

【0038】

具体的には、マウス抗体のCDR とヒト抗体のフレームワーク領域 (FR; framework region) を連結するように設計したDNA 配列を、末端部にオーバーラップす

る部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR 法により合成する。得られたDNA をヒト抗体C 領域をコードするDNA と連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 239400 、国際特許出願公開番号WO 92-19759 参照）。

【0039】

CDR を介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。

キメラ抗体、ヒト型化抗体には、ヒト抗体C 領域が使用される。ヒト抗体C 領域としては、C γ が挙げられ、例えば、C γ 1、C γ 2、C γ 3 又は C γ 4 を使用することができる。また、抗体又はその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C 領域を修飾してもよい。

【0040】

キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来のC 領域からなり、ヒト型化抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域とヒト抗体由来のフレームワーク領域およびC 領域からなり、ヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明に使用される抗体として有用である。

本発明に使用されるヒト型化抗体の好ましい具体例としては、ヒト型化PM-1抗体が挙げられる（国際特許出願公開番号WO 92-19759 参照）。

【0041】

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現される抗体遺伝子、その3' 側下流にポリA シグナルを機能的に結合させたDNA あるいはそれを含むベクターにより発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー（human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer）を挙げることができる。

【0042】

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40 (SV 40)等のウィルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター-1 α (HEF1 α) などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。

例えば、SV 40 プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法 (Mulligan, R. C. et al., Nature (1979) 277, 108-114)、また、HEF1 α プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushima らの方法 (Mizushima, S. and Nagata, S. Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

【0043】

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Ward, E. S. et al., Nature (1989) 341, 544-546; Ward, E. S. et al. FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Better, M. et al. Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379-4383) を使用すればよい。ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切にリフォールド (refold) して使用する (例えば、W096/30394を参照)。

【0044】

複製起源としては、SV 40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺

伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の産生系を使用することができる。抗体製造のための産生系は、in vitroおよびin vivo の産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

【0045】

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、又は真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Veroなど、(2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9、sf21、Tn5などが知られている。植物細胞としては、ニコチアナ・タバクム (Nicotiana tabacum)由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えばアスペルギルス属 (Aspergillus) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) などが知られている。

【0046】

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (E. coli)、枯草菌が知られている。

これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞をin vitroで培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。また、抗体遺伝子を導入した細胞を動物の腹腔等へ移すことにより、in vivo にて抗体を産生してもよい。

【0047】

一方、in vivo の産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系など

がある。

哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシなどを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、昆虫としては、カイコを用いることができる。植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。

【0048】

これらの動物又は植物に抗体遺伝子を導入し、動物又は植物の体内で抗体を産生させ、回収する。例えば、抗体遺伝子をヤギ β カゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい。(Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

【0049】

また、カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の抗体を得る (Maeda, S. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。さらに、タバコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターを *Agrobacterium tumefaciens* のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば *Nicotiana tabacum* に感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得る (Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

【0050】

上述のように *in vitro* 又は *in vivo* の産生系にて抗体を産生する場合、抗体重鎖 (H 鎖) 又は軽鎖 (L 鎖) をコードする DNA を別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよいし、あるいは H 鎖および L 鎖をコードする DNA を単一の発現ベクターに組み込んで、宿主を形質転換させてもよい (国際特許出願公開番号 W0 94-11523 参照)。

本発明で使用する抗体は、本発明に好適に使用され得るかぎり、抗体の断片やその修飾物であってよい。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv 又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv (scFv) が挙げられる。

【0051】

具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M.S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976、Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663、Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669、Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137 参照）。

【0052】

scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域を連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域はリンカー、好ましくは、ペプチドリンカーを介して連結される（Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883）。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、上記抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリンカーとしては、例えばアミノ酸12-19 残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

【0053】

scFvをコードするDNA は、前記抗体のH鎖又は、H鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖又は、L鎖V領域をコードするDNA を鋳型とし、それらの配列のうちの所望のアミノ酸配列をコードするDNA 部分を、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR 法により増幅し、次いで、さらにペプチドリンカー部分をコードするDNA およびその両端を各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせることで増幅することにより得られる。

また、一旦scFvをコードするDNA が作製されれば、それらを含む発現ベク

ター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いて常法に従って、scFvを得ることができる。

【0054】

これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野においてすでに確立されている。

【0055】

前記のように産生、発現された抗体は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティークロマトグラフィーにより行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、プロテインA カラム、プロテインG カラムが挙げられる。プロテインA カラムに用いる担体として、例えば、Hyper D、POROS、Sephacrose F.F.等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。

【0056】

例えば、上記アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば、本発明で用いられる抗体を分離、精製することができる。クロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過等が挙げられる。これらのクロマトグラフィーはHPLC (High performance liquid chromatography) に適用し得る。また、逆相HPLC (reverse phase HPLC) を用いてもよい。

【0057】

上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又はELISA 等により行うことが

できる。すなわち、吸光度の測定による場合には、PBS(-)で適当に希釈した後、280 nmの吸光度を測定し、1 mg/ml を1.35 OD として算出する。また、ELISA による場合は以下のように測定することができる。すなわち、0.1M重炭酸緩衝液 (pH9.6) で 1 μ g/mlに希釈したヤギ抗ヒトIgG (TAGO製) 100 μ l を96穴プレート (Nunc製) に加え、4℃で一晩インキュベーションし、抗体を固相化する。ブロッキングの後、適宜希釈した本発明で使用される抗体又は抗体を含むサンプル、あるいは標品としてヒトIgG (CAPPEL製)100 μ l を添加し、室温にて1時間インキュベーションする。

【0058】

洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG (BIO SOURCE製) 100 μ l を加え、室温にて1時間インキュベートする。洗浄後、基質溶液を加えインキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad 製) を用いて405nm での吸光度を測定し、目的の抗体の濃度を算出する。

本発明で使用されるIL-6改変体は、IL-6受容体との結合活性を有し、且つIL-6の生物学的活性を伝達しない物質である。即ち、IL-6改変体はIL-6受容体に対しIL-6と競合的に結合するが、IL-6の生物学的活性を伝達しないため、IL-6によるシグナル伝達を遮断する。

【0059】

IL-6改変体は、IL-6のアミノ酸配列のアミノ酸残基を置換することにより変異を導入して作製される。IL-6改変体のもととなるIL-6はその由来を問わないが、抗原性等を考慮すれば、好ましくはヒトIL-6である。

具体的には、IL-6のアミノ酸配列を公知の分子モデリングプログラム、たとえば、WHATIF (Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990) 8, 52-56) を用いてその二次構造を予測し、さらに置換されるアミノ酸残基の全体に及ぼす影響を評価することにより行われる。適切な置換アミノ酸残基を決定した後、ヒトIL-6遺伝子をコードする塩基配列を含むベクターを鋳型として、通常行われるPCR 法によりアミノ酸が置換されるように変異を導入することにより、IL-6改変体をコードする遺伝子が得られる。これを必要に応じて適当な発現ベクターに組み込み、前記組換え型抗体の発現、産生及び精製方法に準じてIL-6改変体を得ることができ

る。

【0060】

IL-6改変体の具体例としては、Brakenhoff et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93、及びSavino et al., EMBO J. (1994) 13, 1357-1367、WO 96-18648、WO96-17869に開示されている。

本発明で使用するIL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドは、各々IL-6受容体あるいはIL-6との結合活性を有し、且つIL-6の生物学的活性を伝達しない物質である。即ち、IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドはIL-6受容体又はIL-6に結合し、これらを捕捉することによりIL-6のIL-6受容体への結合を特異的に阻害する。その結果、IL-6の生物学的活性を伝達しないため、IL-6によるシグナル伝達を遮断する。

【0061】

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドは、IL-6又はIL-6受容体のアミノ酸配列においてIL-6とIL-6受容体との結合に係わる領域の一部又は全部のアミノ酸配列からなるペプチドである。このようなペプチドは、通常10～80、好ましくは20～50、より好ましくは20～40個のアミノ酸残基からなる。

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドは、IL-6又はIL-6受容体のアミノ酸配列において、IL-6とIL-6受容体との結合に係わる領域を特定し、その一部又は全部のアミノ酸配列を通常知られる方法、例えば遺伝子工学的手法又はペプチド合成法により作製することができる。

【0062】

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドを遺伝子工学的手法により作製するには、所望のペプチドをコードするDNA配列を発現ベクターに組み込み、前記組換え型抗体の発現、産生及び精製方法に準じて得ることができる。

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドをペプチド合成法により作製するには、ペプチド合成において通常用いられている方法、例えば固相合成法又は液相合成法を用いることができる。

【0063】

具体的には、続医薬品の開発第14巻ペプチド合成 監修矢島治明廣川書店19

91年に記載の方法に準じて行えばよい。固相合成法としては、例えば有機溶媒に不溶性である支持体に合成しようとするペプチドのC末端に対応するアミノ酸を結合させ、 α -アミノ基及び側鎖官能基を適切な保護基で保護したアミノ酸をC末端からN末端方向の順番に1アミノ酸ずつ縮合させる反応と樹脂上に結合したアミノ酸又はペプチドの α -アミノ基の該保護基を脱離させる反応を交互に繰り返すことにより、ペプチド鎖を伸長させる方法が用いられる。固相ペプチド合成法は、用いられる保護基の種類によりBoc法とFmoc法に大別される。

【0064】

このようにして目的とするペプチドを合成した後、脱保護反応及びペプチド鎖の支持体からの切断反応をする。ペプチド鎖との切断反応には、Boc法ではフッ化水素又はトリフルオロメタンスルホン酸を、又Fmoc法ではTFAを通常用いることができる。Boc法では、例えばフッ化水素中で上記保護ペプチド樹脂をアニソール存在下で処理する。次いで、保護基の脱離と支持体からの切断をしペプチドを回収する。これを凍結乾燥することにより、粗ペプチドが得られる。一方、Fmoc法では、例えばTFA中で上記と同様の操作で脱保護反応及びペプチド鎖の支持体からの切断反応を行うことができる。

【0065】

得られた粗ペプチドは、HPLCに適用することにより分離、精製することができる。その溶出にあたり、蛋白質の精製に通常用いられる水-アセトニトリル系溶媒を使用して最適条件下で行えばよい。得られたクロマトグラフィーのプロファイルのピークに該当する画分を分取し、これを凍結乾燥する。このようにして精製したペプチド画分について、マスマスペクトル分析による分子量解析、アミノ酸組成分析、又はアミノ酸配列解析等により同定する。

IL-6部分ペプチド及びIL-6受容体部分ペプチドの具体例は、特開平2-188600、特開平7-324097、特開平8-311098及び米国特許公報US 5210075に開示されている。

【0066】

本発明で使用されるIL-6アンタゴニストのIL-6シグナル伝達阻害活性は、通常用いられる方法により評価することができる。具体的には、IL-6依存性細胞MH60

.BSF2 を培養し、これにIL-6を添加し、同時にIL-6アンタゴニストを共存させることによりIL-6依存性細胞の³H-チミジン取込みを測定すればよい。また、IL-6受容体発現細胞であるU266を培養し、¹²⁵I 標識IL-6を添加し、同時にIL-6アンタゴニストを加えることにより、IL-6受容体発現細胞に結合した¹²⁵I 標識IL-6を測定する。上記アッセイ系において、IL-6アンタゴニストを存在させる群に加えIL-6アンタゴニストを含まない陰性コントロール群をおき、両者で得られた結果を比較すればIL-6アンタゴニストのIL-6阻害活性を評価することができる。

【0067】

本発明の効果を確認するには、脾炎誘発剤、例えばセルレインを過剰投与して脾炎を発症した動物に本発明で使用されるIL-6アンタゴニストを投与し、脾臓の浮腫抑制効果や脾臓の重量改善を評価することにより行うことができる。また、本発明の他の効果として、脾炎の予防効果又は脾炎の再発防止効果がある。

【0068】

脾炎を誘導するためにセルレインを動物に投与する方法は、例えば後述の実施例に記載の方法に従えばよい。また、脾炎を誘導する動物としては、通常実験に用いられる動物でよく、例えばマウス、ラットなどを用いることができる。

後述の実施例に示されるように、抗IL-6受容体抗体の投与により、脾炎を発症した実験動物において、脾臓重量の抑制及び脾臓の浮腫の改善が認められたことから、抗IL-6受容体抗体等のIL-6アンタゴニストは脾炎治療効果を有することが示された。

【0069】

本発明における治療対象は哺乳動物である。治療対象の哺乳動物は、好ましくはヒトである。

本発明の予防又は治療剤は、経口的にまたは非経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、坐薬、注腸、経口性腸溶剤などを選択することができ、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、一回につき体重1 kgあたり0.01 mg から100 mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり1~1000 mg、好ましくは5~50 mgの投与量を選ぶことができる。

【0070】

本発明の予防又は治療剤は、投与経路次第で医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。このような担体および添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン（HSA）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。使用される添加物は、剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組合せて選択されるが、これらに限定されるものではない。

【0071】

【実施例】

以下、実施例、参考例および実験例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1.

B6-hIL-6トランスジェニックマウス又はB6マウス（hIL-6 トランスジェニックマウスの同腹子）（Clinical Immunology and Immunopathology, vol.82, 117-124, 1997）にセルレイン（caerulein、協和発酵製）を生理食塩水に溶解し、50 μ g/kgを1時間おきに7回、マウスに腹腔内投与した。このとき、抗マウスIL-6受容体モノクローナル抗体MR16-1は、最初のセルレイン投与の直前に、1 mg/mouseをマウス尾静脈より投与した。

【0072】

コントロールには抗体の溶媒（PBS）を用いた。8時間後に、マウスを安楽死後、脾重量、血清中アミラーゼ、及び脾臓組織像を観察した。脾重量／体重を図1に示す。脾臓組織像を図2～4に示す。尚、血清アミラーゼヨードデンプン（ブルースターチ）法を用いて測定した。脾臓組織像はパラフィンブロックを作成

後、ヘマトキシリンエオジン（HE）にて染色後、顕微鏡下にて観察した。

IL-6トランスジェニックマウスはその同腹子（正常マウス）に比して、セルレイン投与により誘導される脾臓重量がさらに上昇していた。

【0073】

また、肉眼的な観察でも、浮腫が進行しており脾炎が進行していた。IL-6トランスジェニックマウスにMR16-1を投与することにより、そのセルレイン投与で誘導される脾重量の上昇が抑制された。組織学的に、IL-6トランスジェニックマウス群（図3）と正常マウス群（図2）を比較すると、正常マウスの方が浮腫などの面積が狭く、好中球の浸潤等により侵されている領域が狭かった。これは、MR16-1を投与することにより、改善が見られた（図4）。したがって、セルレイン誘導急性脾炎マウスモデルにおいて、抗IL-6受容体モノクローナル抗体の効果が認められたことにより、抗IL-6受容体抗体等のIL-6アンタゴニストは、IL-6の作用を抑制することで、急性脾炎の治療、重症度の軽減及び発症予防に有用である。

【0074】

実施例2.

B6-hIL-6トランスジェニックマウス又はB6マウス（hIL-6 トランスジェニックマウスの同腹子）（Clinical Immunology and Immunopathology, vol.82, 117-124, 1997）に、生理食塩水に溶解したセルレイン（caerulein、協和発酵製）50 μ g/kgを1時間おきに7回、マウスに腹腔内投与した。また、重症脾炎を惹起するため、最初のセルレイン投与と同時にLPS（lipopolysaccharide, Sigma社製）1 mg/kgを腹腔内投与した。抗マウスIL-6受容体モノクローナル抗体MR16-1は、最初のセルレイン投与の10分前に、1 mg/mouseをマウス尾静脈より投与した。コントロールには抗体の溶媒（PBS）を用いた。8時間後に、マウスを安楽死後、脾重量の測定をおこなった。脾重量/体重を図5に示す。

【0075】

IL-6トランスジェニックマウスに重症脾炎を惹起した場合、MR16-1を投与することにより、著しい改善効果が見られた。したがって、セルレインとLPSにより誘導される重症急性脾炎マウスモデルにおいて、抗IL-6受容体抗体等のIL-6アン

タゴニストは、IL-6の作用を抑制することで、重症急性膵炎の治療、重症度の軽減および発症予防に有用である。

【0076】

参考例 1. ヒト可溶性IL-6受容体の調製

Yamasakiらの方法 (Yamasaki, K. et al., Science (1988) 241, 825-828) に従い得られたIL-6受容体をコードするcDNAを含むプラスミドpBSF2R.236を用いて、PCR 法により可溶性IL-6受容体を作成した。プラスミドpBSF2R.236を制限酵素 Sph I で消化して、IL-6受容体cDNAを得、これをmp18 (Amersham製) に挿入した。IL-6受容体cDNAにストップコドンを導入するようにデザインした合成オリゴプライマーを用いて、インビトロミュータジェネシスシステム (Amersham製) により、PCR 法でIL-6受容体cDNAに変異を導入した。この操作によりストップコドンがアミノ酸345 の位置に導入され、可溶性IL-6受容体をコードするcDNAが得られた。

【0077】

可溶性IL-6受容体cDNAをCHO 細胞で発現するために、プラスミドpSV (Pharmacia製) と連結させ、プラスミドpSVL344 を得た。dhfrのcDNAを含むプラスミドpECEdhfrにHind III-Sal Iで切断した可溶性IL-6受容体cDNAを挿入し、CHO 細胞発現プラスミドpECEdhfr344 を得た。

10 μ g のプラスミドpECEdhfr344 をdhfr-CHO細胞株DXB-11 (Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) ヘカルシウムフォスフェイト沈降法 (Chen, C. et al., Mol. Cell. Biol. (1987) 7, 2745-2751) により、トランスフェクトした。トランスフェクトしたCHO 細胞を1mM グルタミン、10% 透析FCS、100U/ml のペニシリンおよび 100 μ /ml のストレプトマイシンを含むヌクレオシド不含 α MEM 選択培養液で3 週間培養した。

【0078】

選択されたCHO 細胞を限界希釈法でスクリーニングし、単一のCHO 細胞クローンを得た。このCHO 細胞クローンを20nM~200nM の濃度のメトトレキセートで増幅し、ヒト可溶性IL-6受容体産生CHO 細胞株5E27を得た。CHO 細胞株5E27を5%FBSを含むイスコーブ改変ダルベコ培養液 (IMDM, Gibco 製) で培養した。培養上

清を回収し、培養上清中の可溶性IL-6受容体の濃度をELISAにて測定した。その結果、培養上清中には可溶性IL-6受容体が存在することが確認された。

【0079】

参考例 2. 抗ヒトIL-6抗体の調製

10 μ g の組換型IL-6 (Hirano, T. et al., Immunol. Lett. (1988) 17, 41) をフロイント完全アジュバントとともにBALB/cマウスを免疫し、血清中に抗IL-6抗体が検出できるまで一週間毎にこれを続けた。局所のリンパ節から免疫細胞を摘出し、ポリエチレングリコール1500を用いてミエローマ細胞株P3U1と融合させた。ハイブリドーマをHAT 培養液を用いるOiらの方法 (Selective Methods in Cellular Immunology, W.H.Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980) に従って選択し、抗ヒトIL-6抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。

【0080】

抗ヒトIL-6抗体を産生するハイブリドーマは下記のようにしてIL-6結合アッセイをおこなった。すなわち、柔軟なポリビニル製の96穴マイクロプレート (Dynatech Laboratories, Inc. 製, Alexandria, VA) を0.1Mのcarbonate-hydrogen carbonate緩衝液 (pH 9.6) 中で 100 μ l のヤギ抗マウスIg (10 μ l/ml, Cooper Biomedical, Inc製 Malvern, PA) により4 $^{\circ}$ Cで一晩コートした。次いで、プレートを 100 μ l の1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含むPBS により室温で2 時間処理した。

【0081】

これをPBS で洗浄した後、100 μ l のハイブリドーマ培養上清を各穴へ加え、4 $^{\circ}$ Cにて一晩インキュベートした。プレートを洗浄して、2000cpm/0.5ng/wellとなるように 125 I 標識組換型IL-6を各穴へ添加し、洗浄した後各穴の放射活性をガンマカウンター (Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA) で測定した。216 ハイブリドーマクロンのうち32のハイブリドーマクロンがIL-6結合アッセイにより陽性であった。これらのクロンのなかで最終的に安定なMH166.BSF2が得られた。該ハイブリドーマが産生する抗IL-6抗体MH166 はIg G1 κ 型のサブタイプを有する。

【0082】

ついで、IL-6依存性マウスハイブリドーマクローンMH60.BSF2 を用いてMH166 抗体によるハイブリドーマの増殖に関する中和活性を調べた。MH60.BSF2 細胞を 1×10^4 /200 μ l/穴となるように分注し、これにMH166 抗体を含むサンプルを加え、48時間培養し、0.5 μ Ci/ 穴の ^3H チミジン (New England Nuclear, Boston, MA) を加えた後、更に6 時間培養を続けた。細胞をグラスフィルターペーパー上におき、自動ハーベスター (Labo Mash Science Co., Tokyo, Japan) で処理した。コントロールとしてウサギ抗IL-6抗体を用いた。

その結果、MH166 抗体はIL-6により誘導されるMH60.BSF2 細胞の ^3H チミジンの取込みを容量依存的に阻害した。このことより、MH166 抗体はIL-6の活性を中和することが明らかとなった。

【0083】

参考例 3. 抗ヒトIL-6受容体抗体の調製

Hirataらの方法 (Hirata, Y. et al. J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906) により作成した抗IL-6受容体抗体MT18をCNBrにより活性化させたセファロース4B (Pharmacia Fine Chemicals製, Piscataway, NJ) と添付の処方にしたがって結合させ、IL-6受容体 (Yamasaki, K. et al., Science (1988) 241, 825-828) を精製した。ヒトミエローマ細胞株U266を1%ジギトニン (Wako Chemicals製), 10 mMトリエタノールアミン (pH 7.8) および0.15M NaClを含む1mM p-パラアミノフェニルメタンсульフォニルフルオリドハイドロクロリド (Wako Chemicals製) (ジギトニン緩衝液) で可溶化し、セファロース4Bビーズと結合させたMT18抗体と混合した。その後、ビーズをジギトニン緩衝液で6 回洗浄し、免疫するための部分精製IL-6受容体とした。

【0084】

BALB/cマウスを 3×10^9 個のU266細胞から得た上記部分精製IL-6受容体で10日おきに4 回免疫し、その後常法によりハイブリドーマを作成した。成長陽性穴からのハイブリドーマ培養上清を下記の方法にてIL-6受容体への結合活性を調べた。 5×10^7 個のU266細胞を ^{35}S -メチオニン (2.5mCi) で標識し、上記ジギトニン緩衝液で可溶化した。可溶化したU266細胞を0.04ml容量のセファロース4Bビーズと結合させたMT18抗体と混合し、その後、ジギトニン緩衝液で6 回洗浄し、0.

25mlのジギトニン緩衝液 (pH3.4) により³⁵S-メチオニン標識IL-6受容体を流出させ、0.025ml の1M Tris (pH 7.4) で中和した。

【0085】

0.05mlのハイブリドーマ培養上清を0.01mlのProtein G セファロース (Pharmacia 製) と混合した。洗浄した後、セファロースを上記で調製した0.005ml の³⁵S 標識IL-6受容体溶液とともにインキュベートした。免疫沈降物質をSDS-PAGEで分析し、IL-6受容体と反応するハイブリドーマ培養上清を調べた。その結果、反応陽性ハイブリドーマクローンPM-1を樹立した。ハイブリドーマPM-1から産生される抗体は、IgG1 κ 型のサブタイプを有する。

【0086】

ハイブリドーマPM-1が産生する抗体のヒトIL-6受容体に対するIL-6の結合阻害活性をヒトミエローマ細胞株U266を用いて調べた。ヒト組換え型IL-6を大腸菌より調製し (Hirano, T. et al., Immunol. Lett. (1988) 17, 41-45)、ボルトン-ハンター試薬 (New England Nuclear, Boston, MA) により ¹²⁵I 標識した (Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981)。 4×10^5 個のU266細胞を1時間、70% (v/v) のハイブリドーマPM-1の培養上清および14000cpmの ¹²⁵I 標識IL-6とともに培養した。70 μ l のサンプルを 400 μ l のマイクロフュージポリエチレンチューブに 300 μ l のFCS 上に重層し、遠心の後、細胞上の放射活性を測定した。

その結果、ハイブリドーマPM-1が産生する抗体は、IL-6のIL-6受容体に対する結合を阻害することが明らかとなった。

【0087】

参考例4. 抗マウスIL-6受容体抗体の調製

Saito, T. et al., J. Immunol. (1991) 147, 168-173 に記載の方法により、マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体を調製した。

マウス可溶性IL-6受容体を産生するCHO 細胞を10%FCSを含むIMDM培養液で培養し、その培養上清から抗マウスIL-6受容体抗体RS12 (上記Saito, T. et al 参照) をAffigel 10ゲル (Biorad製) に固定したアフィニティーカラムを用いてマウス可溶性IL-6受容体を精製した。

【0088】

得られたマウス可溶性IL-6受容体 $50\mu\text{g}$ をフロイント完全アジュバンドと混合し、ウイスターラットの腹部に注射した。2週間後からはフロイント不完全アジュバンドで追加免疫した。45日目にラット脾臓細胞を採取し、 2×10^8 個を 1×10^7 個のマウスミエローマ細胞P3U1と50%のPEG1500 (Boehringer Mannheim 製) をもちいて常法により細胞融合させた後、HAT 培地にてハイブリドーマをスクリーニングした。

【0089】

ウサギ抗ラットIgG 抗体 (Cappel製) をコートしたプレートにハイブリドーマ培養上清を加えた後、マウス可溶性IL-6受容体を反応させた。次いで、ウサギ抗マウスIL-6受容体抗体およびアルカリフォスファターゼ標識ヒツジ抗ウサギIgG によるELISA 法によりマウス可溶性IL-6受容体に対する抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングした。抗体の産生が確認されたハイブリドーマクローンは2回のサブスクリーニングを行い、単一のハイブリドーマクローンを得た。このクローンをMR16-1と名付けた。

【0090】

このハイブリドーマが産生する抗体のマウスIL-6の情報伝達における中和活性をMH60.BSF2 細胞 (Matsuda, T. et al., J. Immunol. (1988) 18, 951-956) を用いた ^3H チミジンの取込みで調べた。96ウェルプレートにMH60.BSF2 細胞を 1×10^4 個/ $200\mu\text{l}$ /ウェルとなるように調製した。このプレートに 10pg/ml のマウスIL-6とMR16-1抗体又はRS12抗体を $12.3 \sim 1000\text{ng/ml}$ 加えて 37°C 、5% CO_2 で44時間培養した後、 $1\mu\text{Ci}$ /ウェルの ^3H チミジンを加えた。4時間後に ^3H チミジンの取込みを測定した。その結果MR16-1抗体はMH60.BSF2 細胞の ^3H チミジン取込みを抑制した。

したがって、ハイブリドーマMR16-1が産生する抗体は、IL-6のIL-6受容体に対する結合を阻害することが明らかとなった。

【0091】

【発明の効果】

本発明により、抗IL-6受容体抗体等のIL-6アンタゴニストが脾炎の治療効果を

有することが示された。したがって、IL-6アンタゴニストは急性膵炎等の治療剤として有用であることが明らかにされた。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、IL-6トランスジェニックマウスが正常マウスに比べて、セルレイン投与により膵浮腫の結果膵臓重量が増すことを示す図である。また、抗IL-6受容体抗体の投与によりそれが抑制されることを示す図である。

【図 2】

図 2 は、正常マウスにセルレインを投与して急性膵炎を発生させた膵臓の組織の顕微鏡写真であり、生物の形態を表わす図面代用写真である。

【図 3】

図 3 は、IL-6トランスジェニックマウスにセルレインを投与して急性膵炎を発生させた膵臓の組織の顕微鏡写真であり、生物の形態を表す図面代用写真である。

【図 4】

図 4 は、IL-6トランスジェニックマウスにセルレインを投与して急性膵炎を発生させると共にMR16-1を投与した場合の膵臓の組織の顕微鏡写真であり、生物の形態を表す図面代用写真である。

図 2 における正常マウスでのセルレイン誘導膵炎に比べて、図 3 におけるIL-6トランスジェニックマウスでのセルレイン誘導膵炎が増悪しており（すなわち、間質の浮腫、炎症性細胞の浸潤の増加）、これに対して、図 4 においては抗IL-6受容体抗体MR16-1の投与により増悪が抑制されている。

【図 5】

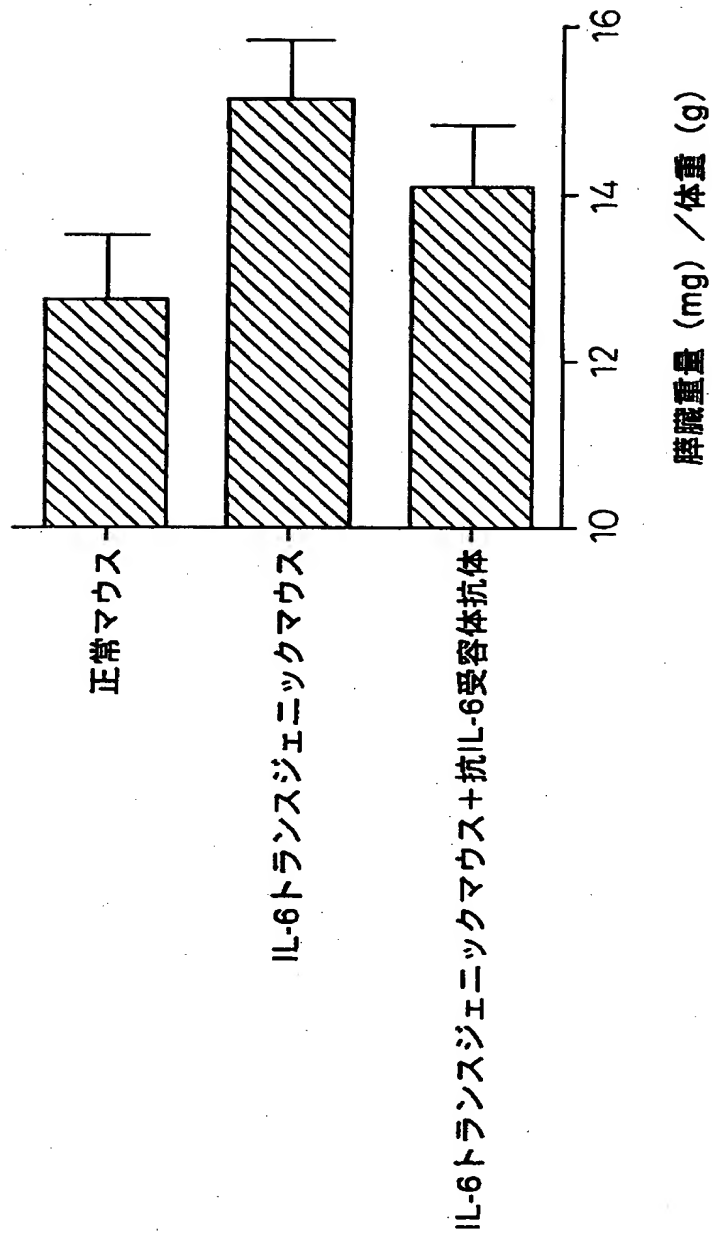
図 5 は、LPS およびセルレイン投与により惹起されたIL-6トランスジェニックマウスにおける膵臓重量の増加が、抗IL-6受容体抗体の投与により抑制されることを示す図である。

【書類名】

図面

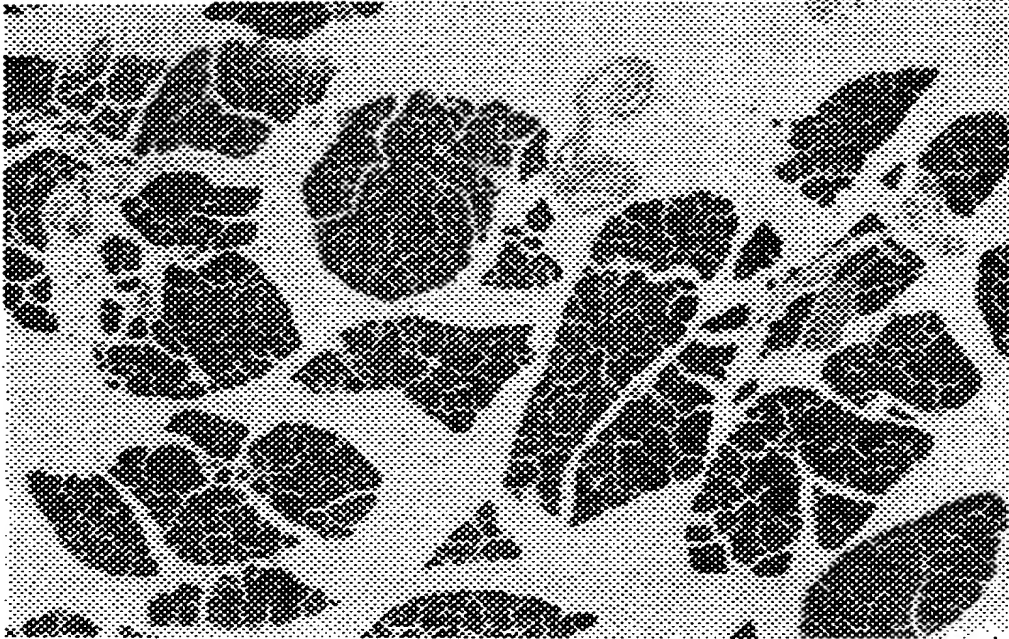
【図 1】

図 1



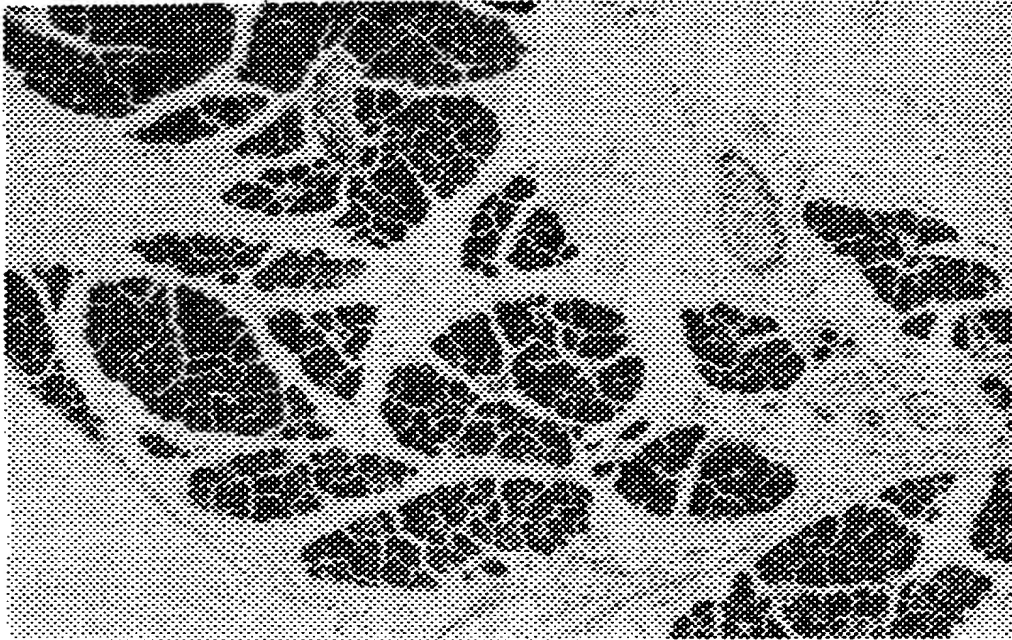
【図 2】

図 2



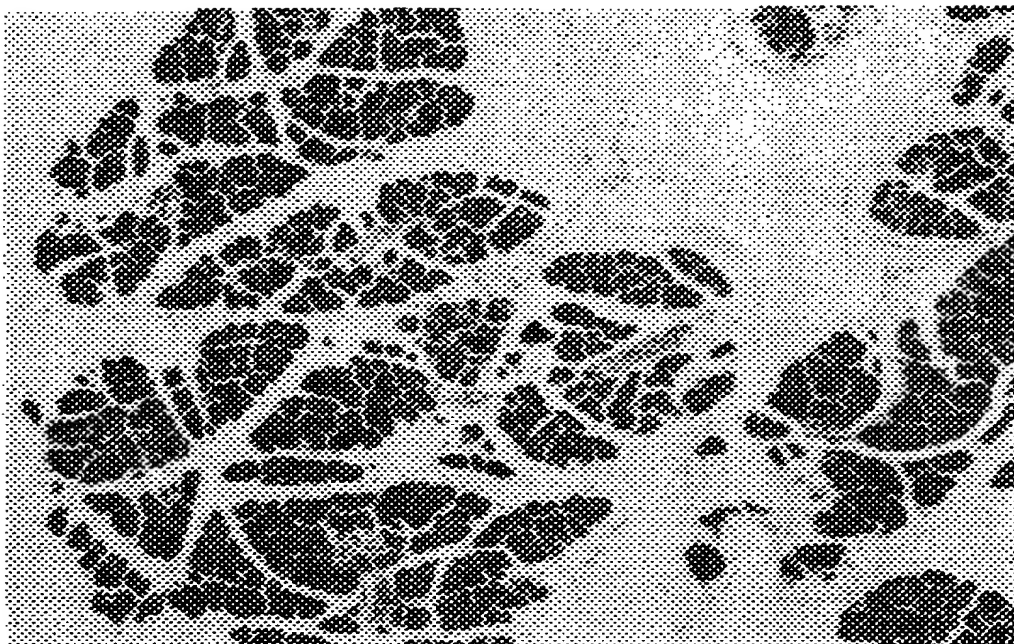
【図3】

図 3



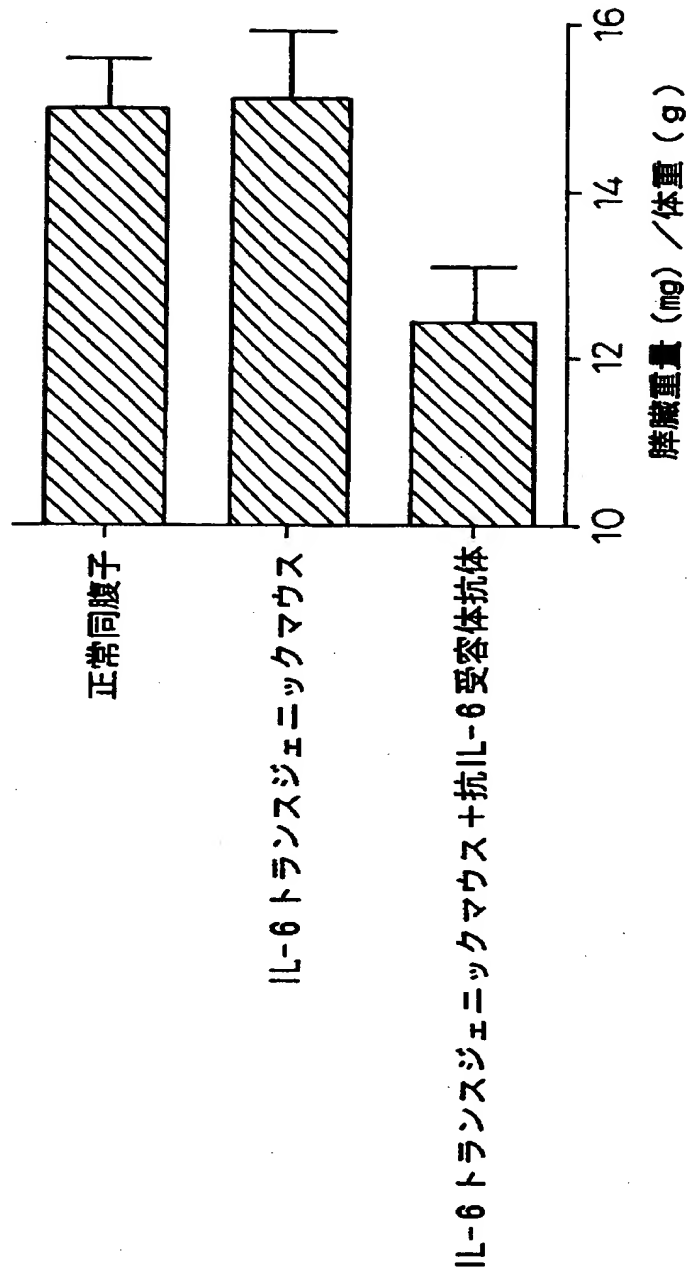
【図4】

図 4



【図 5】

図 5



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 肺炎の新規な予防又は治療剤の提供。

【解決手段】 インターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニスト、例えばIL-6受容体に対する抗体、を含んで成る肺炎の予防又は治療剤。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第054302号
受付番号	59900186261
書類名	特許願
担当官	第六担当上席 0095
作成日	平成11年 3月11日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000003311
【住所又は居所】	東京都北区浮間5丁目5番1号
【氏名又は名称】	中外製薬株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】	100077517
--------	-----------

【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所
----------	------------------------------------

【氏名又は名称】	石田 敬
----------	------

【選任した代理人】

【識別番号】	100087871
--------	-----------

【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所
----------	------------------------------------

【氏名又は名称】	福本 積
----------	------

【選任した代理人】

【識別番号】	100088269
--------	-----------

【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所
----------	------------------------------------

【氏名又は名称】	戸田 利雄
----------	-------

【選任した代理人】

【識別番号】	100082898
--------	-----------

【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所
----------	------------------------------------

【氏名又は名称】	西山 雅也
----------	-------

【選任した代理人】

【識別番号】	100081330
--------	-----------

【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所
----------	------------------------------------

次頁有

認定・付加情報（続き）

【氏名又は名称】 樋口 外治

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003311]

1. 変更年月日 1990年 9月 5日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都北区浮間5丁目5番1号
氏 名 中外製薬株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)